

氏名(本籍)	神谷 宣広 (愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 518 号
学位授与日付	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Establishment of a novel chondrocytic cell line, N1511, derived from p53-null mice
審査委員	(主査) 教授 清水 克 時 (副査) 教授 中 島 茂 教授 柴 田 敏 之

論文内容の要旨

我々は p53 遺伝子欠損マウスの肋軟骨より軟骨分化能を有する細胞株, N1511 を樹立し, その細胞の性状を解析した。N1511 細胞は多角形の形態で増殖し, PTH (上皮小体ホルモン) とデキサメサゾン(合成コルチコイド), あるいは BMP (骨形成因子) とインシュリンの 2 剤併用により分化誘導された。BMP とインシュリンの 2 剤で分化誘導した際は, N1511 細胞は明らかな nodule (細胞小集合体) を形成せず, 同期して分化し, 最終分化に至ることがアルザリンレッド染色やアルカリフォスファターゼ活性によって確認された。一方, PTH とデキサメサゾンの 2 剤で分化誘導した際は, 明らかな nodule 形成を示しつつ分化したが, 全分化過程を通じてアルザリンレッドに染色されずアルカリフォスファターゼ活性も検出されなかった。ノーザンブロット解析では, BMP とインシュリンの 2 剤で分化誘導した場合, II 型, IX 型, X 型コラーゲンが時間経過とともに発現したが, PTH とデキサメサゾンの 2 剤で分化誘導した場合は, II 型, IX 型コラーゲンの発現が前者より遅れ, X 型コラーゲンの発現は抑制されていた。これらの結果より, N1511 細胞は, BMP とインシュリンの 2 剤で分化誘導することにより最終分化にまで達するが, PTH とデキサメサゾンの 2 剤で分化誘導した際は, 分化は遅く, 最終分化が抑制されていることが解った。次に, p53 蛋白を本細胞株に強制発現させたところ, プロモドオキシウリジンの取り込みが低下し, 細胞増殖の抑制が確認された。これらの結果より, N1511 は内軟骨性骨化の全過程を再現する細胞株であり, 他の細胞株と比較し遺伝子的背景が明らかであるため, 軟骨分化機構の解析に適した細胞株であるといえる。さらに, p53 蛋白の発現により増殖を人為的に制御するという事実は, 軟骨再生医学の基礎研究に本細胞株を役立てることができることを示唆している。

方法

- (1) PTH (上皮小体ホルモン) とデキサメサゾン(合成コルチコイド)の 2 剤, あるいは BMP (骨形成因子) とインシュリンの 2 剤併用により N1511 細胞を軟骨細胞へ分化誘導し, その分化過程における形態学的変化を観察した。
- (2) PTH とデキサメサゾンの 2 剤, あるいは BMP とインシュリンの 2 剤併用により N1511 細胞を軟骨へ分化誘導した場合の増殖の違いを, 細胞数を実測することにより比較した。
- (3) PTH とデキサメサゾンの 2 剤, あるいは BMP とインシュリンの 2 剤併用により N1511 細胞を軟骨細胞へ分化誘導した場合の細胞外基質産生をアルシアンブルー, アルザリンレッドの組織染色および抗アグリカン抗体を用いた免疫染色により確認した。
- (4) PTH とデキサメサゾンの 2 剤, あるいは BMP とインシュリンの 2 剤併用により N1511 細胞を軟骨細胞へ分化誘導した場合の骨化の違いをアルカリフォスファターゼ活性測定により比較した。また, 単剤の分化誘導因子を用いて軟骨へ分化させた場合の細胞外基質産生量を ^{35}S の取り込みを用いて測定した。
- (5) PTH とデキサメサゾンの 2 剤, あるいは BMP とインシュリンの 2 剤併用により N1511 細胞を軟骨細胞へ分化誘導した場合の軟骨特異的な遺伝子の発現 (I 型, II 型, IX 型, および X 型コラーゲン) をノーザンブロット法により解析した。また, 最終分化に関与する PTH/PTHrP(上皮小体ホルモン/上皮小体ホルモ

ン関連蛋白)受容体の発現についても検討した。

- (6) p53 蛋白を本細胞株に強制発現させた場合の細胞増殖をブロモデオキシウリジンの取り込みを用いて測定した。また、p53 蛋白を発現している細胞が実際に増殖していないことを確認した。

結果

- (1) PTH とデキサメサゾンの 2 剤の場合は、約 2 週間で明らかな島状の nodule (細胞小集合体) を形成した。一方、BMP とインシュリンの 2 剤併用の場合は、約 1 週間で軟骨細胞へ分化したが、全体の細胞が同期しており、明らかな nodule は形成されなかった。
- (2) 分化誘導後 24 時間で増殖は緩やかになり、その後、PTH とデキサメサゾンの 2 剤の場合は減少する傾向が確認された。
- (3) 軟骨特有の細胞外基質がアルシアンブルー染色や抗アグリカン抗体を用いた免疫染色で確認された。BMP とインシュリンの 2 剤併用の場合はアルザリンレッド染色に陽性であったが、PTH とデキサメサゾンの 2 剤の場合は陰性であった。
- (4) BMP とインシュリンの 2 剤併用の場合は、アルカリフォスファターゼの高い活性が確認された。また、種々の分化誘導因子を単独で用いた場合の細胞外基質産生量は、これら 2 剤の併用と比較して少なかった。
- (5) BMP とインシュリンの 2 剤併用の場合は X 型コラーゲンの発現が確認された。一方、PTH とデキサメサゾンの 2 剤の場合は X 型コラーゲンが認められなかった。これら、アルザリンレッド染色、アルカリフォスファターゼ活性、細胞外基質産生量、および X 型コラーゲンの発現の一連の結果から、PTH とデキサメサゾンの 2 剤併用により分化誘導した場合、最終分化が抑制されると考えられた。また、PTH/PTHrP(上皮小体ホルモン/上皮小体ホルモン関連蛋白)受容体の発現パターンは II 型コラーゲンの発現と類似していた。
- (6) p53 蛋白を N1511 細胞に回復させることにより細胞増殖が抑制された。実際に p53 蛋白を発現している細胞に増殖は見られなかった。この結果は、将来、軟骨細胞の増殖を人為的に操作し、軟骨組織再生を可能にする基礎研究に役立つ細胞株であることを示唆している。

考察および結論

本研究は、p53 遺伝子欠損マウスから樹立した N1511 細胞株が内軟骨性骨化の全過程を *in vitro* で再現することを明らかにした。さらに本細胞株は、腫瘍細胞から樹立された一連の細胞株と比べ、遺伝子的背景が明らかであるという利点がある。N1511 は、今後、軟骨分化メカニズムの解析や軟骨再生医学の基礎研究において最も有効な細胞株であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 神谷宣広は、p53 遺伝子欠損マウスの肋軟骨から軟骨分化能を有する細胞株、N1511 を樹立し、その性状を明らかにした。

これらの新知見は、細胞生物学ならびに整形外科学領域の発展に大きく寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Establishment of a novel chondrocytic cell line, N1511, derived from p53-null mice
Journal of Bone and Mineral Research. 2002 ; 17 : 1832~1842